

VII-22

ArsR タンパク質を細胞表面に導入した組換え大腸菌による ヒ素除去法の検討

東北学院大学大学院 学生員 ○大友 公房
東北学院大学環境防災工学研究所 正会員 及川 栄作
東北学院大学工学部 正会員 石橋 良信

1. はじめに

現在、世界各地でヒ素地下水汚染が表面化している。特にインドの東部からバングラディッシュにまたがるガンジス川流域では、汚染面積の広さや患者数から、過去に例を見ないほど大規模なヒ素地下水汚染が発生している。技術的、経済的な理由からヒ素汚染された地下水を適切な処理をしない生活用水として利用しているケースが多い。その結果、バングラディッシュでは、国民の 95% もの人々が慢性的なヒ素中毒に脅かされている。そのため、一刻も早く安全な水を供給する必要がある、バングラディッシュでも実用可能な安価で簡便なヒ素処理技術が求められている。

微生物の細胞表面は外界環境から直接刺激を受け、多くの情報と物質の伝達が行われている。このことから、細胞表面は反応性に富み、細胞内と外部を繋ぐインターフェイスと捉えることができる。細胞表面工学では、遺伝子組換えにより、微生物の細胞表面に新しく有用な機能を付加した新機能細胞（Arming Cell）を作り出すことが可能である。

本研究では、微生物の細胞表面に遺伝子組換えにより、ヒ素吸着能の高いタンパク質を導入し、微生物によるヒ素除去方法の開発を目的とした。

2. 実験原理

本研究では、遺伝子組換えにより、大腸菌細胞内に作り出される ArsR タンパク質を大腸菌の細胞表面に提示し、細胞表面のヒ素吸着能を向上させヒ素除去を試みた。

ArsR タンパク質は、大腸菌などヒ素耐性菌のゲノムにコードされているヒ素耐性遺伝子群で遺伝子発現の調節を行うリプレッサーのタンパク質である。ヒ素のない環境下で ArsR タンパク質は、ヒ素耐性遺伝子群のオペレーション (*O/P*) 部位に結合することで遺伝子群の発現を抑制している。しかし、ヒ素のある環境下で ArsR タンパク質は、ヒ素耐性遺伝子群を発現させるためにヒ素と優先的に結合し、*O/P* 部位から離れる働きがある。(Fig. 1)

本研究では、大腸菌のペリプラズム層の最外層を構築する *lamB* 遺伝子で、タンパク質の全体構成や 3 量体に悪影響を与えないアミノ酸 153-154 をコードする遺伝子間に *arsR* 遺伝子を導入した。この *lamB-arsR* 合成遺伝子を大腸菌に導入し、細胞表面に ArsR タンパク質を提示した。(Fig. 2)

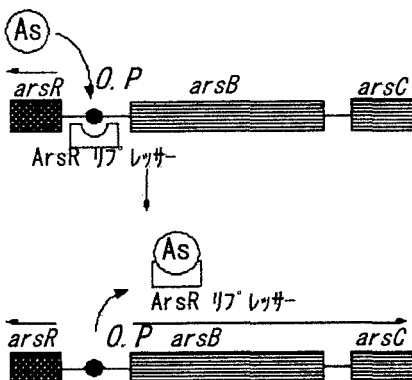


Fig. 1 ヒ素耐性遺伝子群

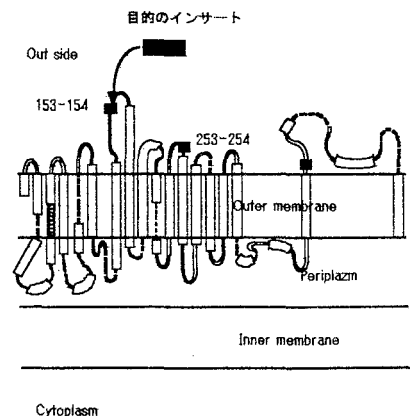


Fig. 2 大腸菌の細胞表面

3. 実験方法

ArsR 遺伝子、*lamB* 遺伝子は共に大腸菌の染色体から PCR クローニングした。ダブル PCR 法により *arsR* 遺伝子の両末端に *Bam*HI サイトを導入した。同様にダブル PCR 法により *lamB* のアミノ酸 153-154 の間に *Bam*HI サイトを導入した。この *lamB* のアミノ酸 153-154 部位をコードする DNA 配列間に *arsR* を導入し *lamB-arsR* 合成遺伝子断片を作り出した。*lamB-arsR* 合成遺伝子断片を遺伝子発現用の pTV118N ベクターに組み込み、大腸菌に導入した。同様に、*ArsR* タンパク質の N 末端に His-tag を導入した *lamB+His-tagged arsR* 合成遺伝子断片を導入した組換え体と、コントロールとして *lamB* 遺伝子のみを大腸菌に導入した組換え体を作成した。

これらの大腸菌を 1×LB+Amp、30℃の温度条件下で培養し、吸光度(OD₆₀₀)を測定した。培養液は 9.5 ml 分注した。これにヒ素を 0.5 ml 加えヒ素の終濃度を 0.5 ppm、終量を 10 ml とした。サンプルは軽くボルテックスをかけ 4℃で静置した。自然沈下のサンプルは菌を自然沈下させ上清を測定した。遠心により菌を沈殿させたサンプルのヒ素除去実験では、2 日間静置したサンプルを 4℃、2500 rpm、5 min 遠心し菌を沈殿させ上清を測定した。

サンプルのヒ素濃度はジエチルジチオカルバミン酸銀による吸光光度法により OD₅₃₅ を測定し、検量線から算出した。

4. 実験結果および考察

菌を自然沈下させた場合では、ヒ素を添加した 2 日後に確認したところ、pTV+*lamB-arsR* のサンプルが他のサンプルより速く菌が沈殿し、菌の沈殿速度の差が確認できた。その後、すべてのサンプルで菌が自然沈下するまで待ち、ヒ素除去率を測定した。結果を (Fig. 3) に示す。これより、pTV+*lamB-arsR* のサンプルが *lamB* のサンプルより 10 % 多くまた pTV+*lamB+His-tagged arsR* のサンプルで 5 % 多く除去できていることが確認できた。

遠心によるヒ素除去率の結果は (Fig. 4) に示す。遠心によるサンプルでヒ素除去率に差異がほとんど見受けられなかった。原因として、遠心力でヒ素が沈殿すること、遠心力により菌に吸着したヒ素が脱着したと考えられる。

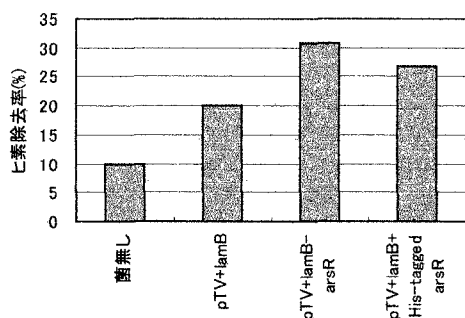


Fig.3 自然沈下によるヒ素除去率

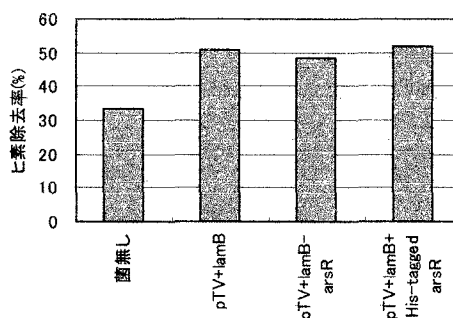


Fig.4 遠心によるヒ素除去率

5. おわりに

本研究により、静置 2 日目の pTV+*lamB-arsR* のサンプルで他のサンプルより速く菌が沈殿し、沈降速度に明かな差が現れたことが確認された。原因として、大腸菌の細胞表面にヒ素が吸着して菌の比重が重くなることで沈降速度が速くなったことが考えられる。ただし、沈殿後の菌の生死については今実験では確認していないため、今後確認する必要がある。

ArsR 遺伝子を導入した大腸菌 pTV+*lamB-arsR*、pTV+*lamB+His-tagged arsR* で、pTV+*lamB* よりも若干高いヒ素除去能があることが認められた。これまで、細胞表面にリプレッサータンパク質を提示して重金属除去が試みられた例はなく、他の重金属除去方法の開発への応用も期待される。

本研究では *lamB* でもある程度ヒ素が除去できたが、大腸菌には元々ヒ素耐性能力があることが知られている。菌とヒ素の接する時間を長くおけば置くほど馴化し、ヒ素除去は菌量に依存してくることも十分考えられる。今後の実験の課題として、ヒ素と大腸菌を短い時間反応させた場合のヒ素除去率の変化を把握する必要がある。